



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Pat ntschrift**
⑩ **DE 197 36 198 C 1**

⑲ Aktenzeichen: 197 36 198.6-41
⑳ Anmeldetag: 20. 8. 97
㉑ Offenlegungstag: -
㉒ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 24. 12. 98

㉓ Int. Cl.⁶:
C 07 K 16/00
C 07 K 14/245
A 61 K 31/70
A 61 K 38/16
C 07 K 14/435
A 61 K 7/06
C 12 N 15/11
C 12 N 15/63
C 12 N 1/00
C 12 N 5/10
A 61 K 48/00
G 01 N 33/53

// G01N 33/68, C12Q 1/68

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

㉔ Patentinhaber:
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

㉕ Vertreter:
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea
Schüßler, 81825 München

㉖ Erfinder:
Dear, Terence N., Dipl.-Biol. Dr., 69123 Heidelberg,
DE; Boehm, Thomas, Prof. Dr., 69126 Heidelberg,
DE

㉗ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
Gene 138, S. 197-200, 1994;

㉘ Protease-verwandtes Protein

㉙ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protease-ver-
wandtes Protein, eine ein solches kodierende DNA und
ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner be-
trifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Pro-
teins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper und
antagonistische Substanzen.

DE 197 36 198 C 1

DE 197 36 198 C 1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protease-verwandtes Protein, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

Eine Haaranomalie ist häufig durch eine gestörte Keratinisierung des Haares bedingt. Aus Untersuchungen mit Nacktmäusen ist bekannt, daß das Genprodukt eines mit *whn* bezeichneten Gens für die Keratinisierung des Haares wichtig ist. Dieses Genprodukt ist ein Transkriptionsfaktor. Seine Zielgene sind allerdings nicht bekannt. Insofern ist es nicht möglich, in die Keratinisierung des Haares einzugreifen. Dies wäre aber wünschenswert, insbesondere wenn die Keratinisierung des Haares gestört ist.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem die Keratinisierung des Haares untersucht und gegebenenfalls reguliert werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Protease-verwandtes Protein, wobei das Protein die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß das Genprodukt des *whn*-Gens für die Regulation der Expression von mindestens drei Genen verantwortlich ist. Zwei dieser Gene kodieren für die bekannten Keratine Ha3 (vgl. Winter, H. et al., Exp. Cell Res. 212 (1994), 190-200) bzw. CK15 (vgl. Nozaki, M. et al., Gene 138 (1994), 197-200). Das dritte Gen kodiert für ein Protein, das Homologien zu einer Protease der Kallikrein-Familie, gegebenenfalls eine Protease-Aktivität aufweist, sich aber von einer bekannten Protease der Kallikrein-Familie auf dem DNA-Level durch Hybridisierung unter üblichen Bedingungen unterscheidet. Ein solches Protein weist die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz auf. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß bei Fehlen des Genprodukts des *whn*-Gens die Gene von Ha3 und CK15 unterexprimiert sind, während das Gen vorstehenden Proteins überexprimiert ist.

In der vorliegenden Erfindung wird vorstehendes Protein mit "Protease-verwandtes Protein" (PVP) bezeichnet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für ein (PVP) kodierende Nukleinsäure. Dies kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z. B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, gemäß Anspruch 2.

Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.

Ein Abschnitt der DNA von Fig. 1 wurde bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als pRDA2-1a unter DSM 11522 am 23.

Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben. Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA ist es günstig, mRNA aus Hautzellen von *whn*(+/+)- bzw. *nu/nu* (*whn*(-/-))-Mäusen zu isolieren, die mRNA in cDNA umzuschreiben und die cDNA einem "Representational Difference Analysis" (RDA)-Verfahren (vgl. Hubank, M. and Schatz, D., Nucleic Acids Research 22 (1994), 5640-5648) zu unterziehen, wodurch jene cDNA identifiziert wird, die in *nu/nu*-Mäusen im Vergleich zu *whn*(+/+)-Mäusen unter- bzw. überexprimiert wird. Insbesondere letztere cDNA stellt eine erfindungsgemäße cDNA dar.

Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z. B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z. B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z. B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine, erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die *E. coli*-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen Ltk, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße cDNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße cDNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

Desweiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, die Keratinisierung des Haares zu untersuchen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (PVP) in Zellen, insbesondere Hautzellen, nachgewiesen werden. Es kann eine Beziehung von (PVP) zur Keratinisierung des Haares hergestellt werden. Ferner kann mit einem erfindungsgemäßen (PVP) ein gegen dieses Protein gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen. Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die

Expression des für (PVP) kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, erfolgen.

Darüberhinaus eignet sich die vorliegende Erfindung, regulierend in die Keratinisierung des Haares einzugreifen. Diese Regulierung kann positiver oder negativer Art sein. Als positive Regulierung ist jene zu verstehen, mit der einer gestörten Keratinisierung des Haares begegnet werden kann. Eine negative Regulierung würde vorliegen, wenn eine normale bzw. starke Keratinisierung des Haares abgeschwächt wird.

Für eine positive Regulierung der Keratinisierung des Haares bietet es sich an, (PVP) in Form eines es inhibierenden Stoffes zu verwenden. Dieser Stoff kann ein erfindungsgemäßer Antikörper sein. Ferner kann er ein Anti-Sinn-Oligonukleotid sein, das sich zur Expressions-Inhibierung des für (PVP) kodierenden Gens eignet. Desweiteren kann der Stoff ein solcher sein, der zu (PVP) antagonistisch wirkt. Von Vorteil kann es sein, wenn mehrere der Stoffe verwendet werden. Besonders günstig kann es sein, wenn zusätzlich ein oder mehrere der Proteine Ha3 und CK15 als solche oder in Form von sie exprimierenden Nukleinsäuren verwendet werden.

Für eine negative Regulierung der Keratinisierung des Haares bietet es sich an, (PVP) als solches oder in Form einer es exprimierenden Nukleinsäure zu verwenden. Von Vorteil kann es sein, wenn zusätzlich ein oder mehrere der Proteine Ha3 und CK15 in Form von sie inhibierenden Stoffen verwendet werden. Solche Stoffe können gegen Ha3 bzw. CK15 gerichtete Antikörper oder Anti-Sinn-Oligonukleotide sein, die sich zur Expressions-Inhibierung der für Ha3 bzw. CK15 kodierenden Gene eignen. Auch können die Stoffe solche sein, die antagonistisch zu Ha3 bzw. CK15 wirken.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Mittel, das sich zur Regulierung der Keratinisierung des Haares eignet. Für die Zusammensetzung eines solchen Mittels gelten vorstehende Ausführungen hinsichtlich der positiven und negativen Regulierung der Keratinisierung des Haares entsprechend.

Die vorliegende Erfindung stellt somit einen großen Beitrag zum Verständnis der Keratinisierung des Haares und zu einem möglichen regulierenden Eingreifen dar.

Kurze Beschreibung der Zeichnung:

Fig. 1 zeigt die Basensequenz einer erfindungsgemäßen cDNA sowie die davon abgeleitete Aminosäuresequenz eines erfindungsgemäßen (PVP).

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA

Eine erfindungsgemäße cDNA wurde gemäß des "Representational Difference Analysis" (RDA)-Verfahrens hergestellt. Dieses Verfahren umfaßt die Isolierung von mRNA aus Hautzellen von whn(+/-)-Mäusen bzw. nu/nu-Mäusen, die Umschreibung der mRNA in cDNA und die Differenzierung der cDNA, wodurch solche identifiziert wird, die in nu/nu-Mäusen unter- bzw. überexprimiert wird. Insbesondere letztere stellt eine erfindungsgemäße cDNA dar.

A) Sequenz der Oligonukleotidadaptoren

Folgende Oligonukleotidadaptorenpaare wurden für die RDA benötigt:

R-Bgl-12: 5'-GATCTGCGGTGA-3'

R-Bgl-24: 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3'

R-Bgl-12: 5'-GATCTGTTCATG-3'

R-Bgl-24: 5'-ACCGACGTGACTATCCATGAACA-3'

N-Bgl-12: 5'-GATCTTCCCTCG-3'

N-Bgl-24: 5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'

B) Herstellung von poly A-mRNA aus den miteinander zu vergleichenden Geweben

Zunächst wurde RNA aus der Haut von whn(+/-)- bzw. nu/nu-Mäusen nach der "Single-Step RNA-Extraction"-Methode (Chomczynski and Sacchi, 1987) gewonnen. Die poly A-mRNA-Fractionen aus den beiden RNA-Populationen wurden anschließend mit Hilfe von Dynabeads Oligo(dT) nach dem entsprechenden Protokoll der Firma Dynal isoliert.

C) Synthese doppelsträngiger cDNA

Zur Synthese von doppelsträngiger whn(+/-)- bzw. nu/nu-cDNA wurde das "Ribo Clone cDNA Synthesis Kit" der Firma Promega verwendet. Jeweils 4 µg poly A-mRNA wurden eingesetzt, um ungefähr 2 µg cDNA zu erhalten.

D) Differenzanalyse

1. Restriktionsverdau der doppelsträngigen cDNAs

a) Ungefähr 2 µg jeder cDNA wurden in einem 100 µl-Reaktionsansatz mit der Restriktionsendonuklease DpnII 2 h bei 37°C verdaut.

b) Die Reaktionslösungen wurden anschließend zweimal mit einem Phenol/Chloroform-Gemisch (1 : 1) und einmal mit 100%igem Chloroform extrahiert.

c) Die in den wäßrigen Phasen der beiden Reaktionsansätze enthaltene DNA wurde jeweils mit 2 µg Glykogen, 50 µl 10 M Ammoniumacetat und 650 µl 100% Ethanol versetzt und 20 min auf Eis gefällt.

Nach 14-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14000 upm wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung der alkoholischen Phase wurde die getrocknete DNA in 20 µl TE-Puffer resuspendiert.

2. Ligation der cDNAs an das R-Bgl-Oligonukleotidadaptorenpaar

a) In einem Reaktionsgefäß wurden vereinigt:

20 µl geschnittene cDNA (gesamter Reaktionsansatz aus Punkt D) 1c)

8 µg R-Bgl-24

4 µg R-Bgl-12

6 µl 10 × Ligase Puffer

x µl Wasser

57 µl Endvolumen

b) Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler (Peltier Thermocycler PTC-200, MJ Research) auf 50°C erhitzt, 1 min auf dieser Temperatur gehalten und dann im Laufe einer Stunde wieder auf 10°C abgekühlt (ramp rate: 0,1°C/9 sec).

c) Nach Hinzufügen von 3 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl) wurde das Gemisch über Nacht bei 16°C inkubiert.

3. Synthese von "Repräsentationen" der miteinander zu vergleichenden cDNA-Populationen

a) Zur Generierung sog. "Repräsentationen" der ligierten cDNAs wurde zunächst das Volumen der Ligationsansätze aus Punkt 2c) durch Zugabe von jeweils 140 µl Wasser auf 200 µl ergänzt.

Aus dieser verdünnten Lösung wurden dann pro cDNA-Population (whn(+/-) bzw. nu/nu-Haut) 30 Reaktionen zu jeweils 200 µl angesetzt.

Einem solchen Ansatz wurden der Reihe nach folgende Reaktanden zugegeben:

143 µl Wasser

20 µl 10 × PCR-Puffer

20 µl 2 mM dNTPs

10 µl 25 mM Mg-Chlorid

2 µl R-Bgl-24 (1 µg/µl)

4 µl verdünnter Ligationsansatz

b) PCR:

3 min: 72°C

Hinzufügen von 1 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)

20 ×: 5 min: 95°C

3 min: 72°C

zuletzt: Abkühlen auf 4°C.

c) Zur Aufbereitung der Reaktionslösungen wurden jeweils 4 Reaktionsansätze in einem Gefäß vereinigt.

Extraktion: 2 × mit jeweils 700 µl Phenol/Chloroform (1 : 1), 1 × mit Chloroform 100%;

Fällung: Zugabe von 75 µl 3 M Na-Acetatlösung (pH 5,3) und 800 µl 2-Propanol zu jedem Reaktionsgefäß, 20 min Eis.

Zentrifugation: 14 min. 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70% und Resuspension in soviel Wasser, daß eine Konzentration von 0,5 µg/µl resultierte.

4. Restriktionsverdau der "Repräsentationen"

a) Zur Entfernung der R-Bgl-Oligonukleotidadaptoren wurden 300 µg jeder Repräsentation (whn(+/-)-Haut bzw. nu/nu-Haut) einem Restriktionsverdau unterzogen. Es wurde nach Zugabe der folgenden Reaktanden 4 h bei 37°C inkubiert:

600 µl cDNA-Repräsentation (0,5 µg/µl)

140 µl 10 × DpnII-Puffer

100 µl DpnII (10 U/µl)

560 µl Wasser.

b) Der Restriktionsverdau-Ansatz wurde vor dessen Aufbereitung auf 2 Gefäße aufgeteilt.

Extraktion: 2 × Phenol/Chloroform (1 : 1), 1 × Chloroform 100%;

Fällung: Zugabe von 70 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 700 µl 2-Propanol zu jedem Gefäß, 20 min Eis;

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70% und Resuspension in soviel Wasser, daß eine Konzentration von 0,5 µg/µl resultierte.

Die so erhaltene, DpnII-verdaute whn(+/-)-Haut-cDNA-Repräsentation stellte die in der subtraktiven Hybridisierung einzusetzende Driver-DNA-Population dar.

5. Synthese der Tester-DNA-Population

a) 20 µg der mit DpnII verdauten nu/nu-Haut-cDNA-Repräsentation (= Tester-DNA) wurden in einem TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt:

- 40 µl Tester-DNA (0,5 µg/µl)
 50 µl Te-Puffer
 10 µl 10 × Loading Buffer
 wurden auf ein 1, 2% Agarose-TAE-Gel aufgetragen. Es wurde solange Spannung an das Gel gelegt, bis die Bromphenolblau-Komponente des Loading Buffers ungefähr 2 cm weit gewandert war. 5
 b) Anschließend wurden die Repräsentations-DNA enthaltenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des "Agarose Gel DNA Extraction Kits" der Firma Boehringer Mannheim eluiert.
 Die DNA-Extrakte wurden vereinigt, so daß insgesamt 60 µl Lösung erhalten wurden. Die Konzentration dieser Lösung wurde durch Elektrophorese von 5 µl in einem 1% Agarose-Gel abgeschätzt.
 c) Zuletzt erfolgte eine Ligation der Tester-DNA mit dem J-Oligonukleotid-Paar: 10
 2 µg Tester-DNA-Eluat
 6 µl 10 × Ligase Puffer
 4 µl J-Bgl-24 (2 µg/µl)
 4 µl J-Bgl-12 (1 µg/µl)
 x µl Wasser 15
 57 µl Endvolumen
 d) Überführung des Reaktionsansatzes in Thermocycler:
 1 min: 50°C
 Abkühlen auf 10°C in 1 h (ramp rate: 0,1°C/9 sec).
 e) Nach Hinzufügen von 3 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl) Inkubation bei 16°C über Nacht. 20
 f) Einstellung der Konzentration der Tester-DNA auf ungefähr 10 ng/µl durch Zugabe von 120 µl Wasser.
 6. Subtraktive Hybridisierung
 a) 80 µl Driver-DNA (40 µg) aus Schritt 4. und 40 µl (0,4 µg) verdünnte, mit J-Oligonukleotiden ligierte Tester-DNA aus Schritt 5. wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt und 2 × mit Phenol/Chloroform (1 : 1) und einmal mit Chloroform 100% extrahiert. 25
 b) Fällung durch Zugabe von 30 µl 10 M Ammoniumacetat, 380 µl Ethanol 100%; 10 min -70°C.
 Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.
 Anschließend: 2 × Waschen des Pellets mit Ethanol 70%, kurze Zentrifugation nach jedem Waschschrift; Trocknen des DNA-Pellets.
 c) Die Resuspension der DNA erfolgte in 4 µl EE x3-Puffer (30 mM EPPS, pH 8,0 bei 20°C (Firma Sigma), 3 mM EDTA) – hierbei wurde ungefähr 2 min auf- und abpipettiert, dann 5 min auf 37°C erwärmt, kurz "ge-vortext" und zuletzt die Lösung durch Zentrifugieren wieder am Gefäßboden vereinigt. Zuletzt wurde die Lösung mit 35 µl Mineralöl überschichtet. 30
 d) Überführen des Reaktionsansatzes in Thermocycler:
 5 min: 98°C, 35
 Abkühlen auf 67°C und sofortige Zugabe von 1 µl 5 M NaCl zur DNA.
 20 h Inkubation bei 67°C.
 7. Synthese des ersten Differenzprodukts
 a) Nachdem das Mineralöl möglichst vollständig entfernt worden war, wurde die DNA schrittweise verdünnt:
 1. Zugabe von 8 µl TE (+ 5 µg/µl Hefe-RNA), 40
 2. Zugabe von 25 µl TE – danach gründliches Mischen,
 3. Zugabe von 362 µl TE – Vortex.
 b) Für jede subtraktive Hybridisierung wurden 4 PCRs angesetzt. Pro Reaktion:
 127 µl Wasser
 20 µl 10 × Puffer 45
 20 µl 2 mM dNTPs
 5 µl 25 mM Mg-Chlorid
 20 µl verdünnte Hybridisierungslösung (aus Schritt 7a))
 c) PCR-Programm:
 3 min: 72°C 50
 Zugabe von 1 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
 5 min: 72°C
 Zugabe von 2 µl Primer J-Bgl-24 (1 µg/µl)
 10x: 1 min: 95°C
 3 min: 70°C 55
 zuletzt: 10 min: 72°C; dann Abkühlen auf Raumtemperatur.
 d) Die 4 Reaktionsansätze wurden in einem 1,5 ml-Gefäß vereinigt.
 Extraktion: 2 × Phenol/Chloroform (1 : 1), 1 × Chloroform 100%.
 Nach Zugabe von 2 µg Glykogen Carrier:
 Fällung mit 75 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800 µl 2-Propanol, 20 min Eis. 60
 Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.
 Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70%.
 Nach Trocknen der DNA Resuspension in 40 µl Wasser.
 e) 20 µl der resuspendierten DNA aus d) wurden einem "Mung Bean Nuclease-Verdau" (= MBN) unterzogen:
 20 µl DNA 65
 4 µl 10x Mung Bean Nuclease Buffer (Fa. NEB)
 14 µl Wasser
 2 µl Mung Bean Nuclease (10 U/µl; Fa. NEB)

35 min. 30°C.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 160 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,9) und 5-minütige Inkubation bei 98°C abgebrochen. Anschließend wurde das Gefäß bis zum nächsten Schritt auf Eis gesetzt.

f) Während der MBN-Inkubation wurden 4 weitere PCRs angesetzt (auf Eis):

127 µl Wasser
20 µl 2 mM dNTPs
10 µl 25 mM Mg-Chlorid
2 µl J-Bgl-24 (1 µg/µl)
20 µl MBN-verdaute DNA.

g) PCR-Programm:

1 min. 95°C

Abkühlenlassen auf 80°C, Zugabe von 1 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl), 18x: 1 min: 95°C; 3 min: 70°C, zuletzt: 10 min: 72°C; Abkühlenlassen auf 4°C.

h) Die 4 PCR-Ansätze wurden in einem Gefäß vereinigt.

Extraktion: 2x Phenol/Chloroform (1 : 1), 1 x Chloroform 100%.

Fällung: 75 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800 µl 2-Propanol, 20 min Eis.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des DNA-Pellets mit Ethanol 70%.

Resuspension der DNA in 100 µl Wasser (resultierende Konzentration: 0,5 µg/µl); die auf diese Weise erhaltene Lösung stellte das erste Differenzprodukt dar.

8. Austausch der Oligonukleotidadaptoren des Differenzprodukts

a) Entfernung der Oligonukleotidadaptoren durch Restriktionsverdau mit DpnII:

40 µl Differenzprodukt 1 (0,5 µg/µl)

30 µl 10 x DpnII Puffer

15 µl DpnII (10 U/µl)

215 µl Wasser

2 h 37°C.

b) Aufarbeitung des Reaktionsansatzes:

Extraktion: 2 x Phenol/Chloroform (1 : 1), 1x Chloroform 100%.

Fällung: 33 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,3), 800 µl Ethanol 100%, 20 min -20°C.

Zentrifugation: 14 min, 14000 rpm, 4°C.

Waschen des Pellets in Ethanol 70% und Resuspension in 40 µl Wasser.

c) Ligation des Differenzprodukts an N-Bgl-Oligonukleotidadaptorenpaar

1 µl der aufgearbeiteten DNA-Lösung aus Schritt b) wurde mit 9 µl Wasser zu einer Konzentration von 50 ng/µl verdünnt; 4 µl dieser Lösung wurden in folgender Reaktion eingesetzt:

4 µl DpnII verdautes Differenzprodukt 1 (200 ng)

6 µl 10x Ligase Puffer

2,5 µl N-Bgl-24 (3,5 µg/µl)

2 µl N-Bgl-12 (2 µg/µl)

42,5 µl Wasser.

d) Nach Überführen des Reaktionsansatzes in Thermocycler:

1 min: 50°C,

Abkühlenlassen innerhalb einer Stunde auf 10°C (ramp rate: 0,1°C/9 sec).

e) Nach Hinzugeben von 3 µl T4 DNA Ligase (1 µg/µl), Inkubation bei 16°C über Nacht.

9. Synthese des 2. Differenzprodukts

Der Ligationsansatz aus Schritt 8e) wurde durch Zugabe von 100 µl Wasser auf eine Konzentration von 1,25 ng/µl verdünnt. 40 µl dieser Verdünnung (50 ng) wurden mit 80 µl Driver-DNA (siehe Punkt 4.) gemischt und erneut gemäß den Schritten 6. bis 8. behandelt. Beim Wechsel der Oligonukleotidadaptoren (Schritt 8.) wurden dieses Mal die J-Bgl-Oligonukleotide an das neu entstandene Differenzprodukt 2 ligiert.

10. Synthese des 3. Differenzprodukts

Die Konzentration des mit den J-Bgl-Oligos ligierten Differenzprodukts 2 wurde auf eine Konzentration von 1 ng/µl reduziert. 10 µl dieser Lösung wurden wiederum mit 990 µl Wasser (+ 30 µg Hefe-RNA) verdünnt, so daß die Konzentration nunmehr 10 µg/µl betrug. Die subtraktive Hybridisierung wurde mit 100 µg (10 µl) J-ligiertem Differenzprodukt 2 und 40 µg (80 µl) Driver-DNA aus Schritt 4.) durchgeführt. Ansonsten wurde wie beim 1. und 2. Differenzprodukt nach den Schritten 6. bis 8. vorgegangen. Eine Ausnahme bildete die PCR nach der MBN-Reaktion (Punkt 7.g) – hier wurden nur 18 statt 22 Cycles durchgeführt.

11. Klonierung des 3. Differenzprodukts

Das 3. Differenzprodukt wurde zunächst einem Restriktionsverdau mit DpnII unterzogen, wodurch die Oligonukleotidadaptoren entfernt wurden. Das Reaktionsprodukt wurde anschließend auf ein TAE-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die getrennten DNA-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA eluiert und in einen mit BamHI geschnittenen Vektor (pBS Not) kloniert.

12. Charakterisierung der Differenzprodukte

Um zu bestätigen, daß es sich bei den klonierten DNA-Fragmenten nicht um Methodenartefakte handelte, sondern um Sequenzen, die tatsächlich in den untersuchten DNA-Repräsentationen enthalten waren, wurden Southern Analysen durchgeführt, bei denen die untersuchten cDNA-Repräsentationen mit den radioaktiv markierten Klonierungsprodukten hybridisiert wurden.

Anschließend wurden diejenigen DNA-Fragmente, die sich in der Southern Analyse als "echte" Differenzprodukte erwiesen hatten, mittels Northern Hybridisierungen untersucht: es wurden RNAs aus den untersuchten Geweben

(whn(++)-Haut-cDNA und nu/nu-Haut-cDNA) geblottet und mit den radioaktiv markierten Klonierungsprodukten hybridisiert. Hierdurch wurde die differentielle Expression dieser Sequenzen in den untersuchten Geweben bestätigt. Eine Analyse der Sequenzen ergab die erfindungsgemäße cDNA von Fig. 1.

Beispiel 2: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen (PVP)

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen (PVP) wird der Vektor pBSNot-PVP von Beispiel 1 mit BamHI gespalten, die für (PVP) kodierende DNA isoliert und in den mit BamHI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Quiagen) inseriert. Es wird das Expressionsplasmid pQ/PVP erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen (PVP) von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQ/PVP wird zur Transformation von *E. coli* SG 13009 (vgl. Gottesman, S. et al., *J. Bacteriol.* 148, (1981), 265–273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Quiagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J. O. und Kornberg, R. D., *J. Mol. Biol.* 149 (1975), 709–733).

So kann ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden.

Beispiel 3: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 wird einer 18% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 25 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein werden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)

Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)

Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, (1984), 203–209). Die Western Blot-Analyse wird wie in Bock, C.-T. et al., *Virus Genes* 8, (1994), 215–229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1 : 10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1 : 5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolyphosphat, 400µM Nitroblau-tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

So können erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

Pro Immunisierung werden 40 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden so erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

Pro Immunisierung werden 12 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung war das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

Tag 56: 3. Immunisierung (icFA) Tag 84: 4. Immunisierung (PBS) Tag 87: Fusion

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden so nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Protease-verwandtes Protein, wobei das Protein die Aminosäuresequenz von **Fig. 1** oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt, wobei das Protein mit letzterer Aminosäuresequenz sich von einer bekannten Protease der Kallikrein-Familie auf dem DNA-Level durch Hybridisierung unter üblichen Bedingungen unterscheidet und **Fig. 1** Bestandteil dieses Anspruchs ist.
2. DNA, kodierend für ein Protein nach Anspruch 1, wobei die DNA umfaßt:
 - (a) die DNA von **Fig. 1** oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, wobei letztere DNA sich von jener einer bekannten Protease der Kallikrein-Familie durch Hybridisierung unter üblichen Bedingungen unterscheidet, und **Fig. 1** Bestandteile dieses Anspruchs ist oder
 - (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
3. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 2.
4. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 3.
5. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 4 unter geeigneten Bedingungen.
6. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 1.
7. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 und der DNA nach Anspruch 2 sowie des Antikörpers nach Anspruch 6 zum Nachweis der Keratinisierung des Haares.
8. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 zur negativen Regulierung der Keratinisierung des Haares.
9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei das Protein als solches oder in Form einer es exprimierenden Nukleinsäure vorliegt.
10. Verwendung nach Anspruch 8 oder 9, wobei ferner Stoffe eingesetzt werden, welche die Proteine Ha3 und/oder CK15 inhibieren.
11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die Stoffe gegen Ha3 bzw. CK15 gerichtete Antikörper und/oder Anti-Sinn-Oligonukleotide sind, welche die Expression der diese Proteine kodierenden Nukleinsäuren inhibierenden.
12. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 zur positiven Regulierung der Keratinisierung des Haares.
13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das Protein in Form eines es inhibierenden Stoffes vorliegt.
14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei der Stoff ein Antikörper nach Anspruch 6 und/oder ein Anti-Sinn-Oligonukleotid ist, das die Expression der das Protein kodierenden Nukleinsäure inhibiert.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei ferner die Proteine Ha3 und/oder CK15 als solche oder in Form von sie exprimierenden Nukleinsäuren vorliegen.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

5'-	TAG	GTG	GTG	TCA	TTC	CCC	TCC	AAC	CTG	AGT	GCT	GGC	AGG	TAC	42	
								M	P	M	K	M	L	T	M	8
	ACT	GCT	GGC	CAC	CAG	CAG	ATG	CCC	ATG	AAG	ATG	CTG	ACA	ATG	84	
	K	M	L	A	L	C	L	V	L	A	K	S	A	W	22	
	AAG	ATG	CTG	GCC	CTG	TGC	TTG	GTT	CTT	GCT	AAA	TCA	GCC	TGG	126	
	S	E	E	Q	E	K	V	V	H	G	G	P	C	L	36	
	TCG	GAG	GAA	CAG	GAG	AAG	GTG	GTT	CAT	GGA	GGC	CCG	TGT	TTG	168	
	K	D	S	H	P	F	Q	A	A	L	Y	T	S	G	50	
	AAG	GAC	TCC	CAC	CCT	TTC	CAG	GCT	GCC	CTC	TAC	ACC	TCA	GGT	210	
	H	L	L	C	G	G	V	L	I	D	P	Q	W	V	64	
	CAC	TTG	CTG	TGT	GGT	GGG	GTC	CTC	ATT	GAC	CCA	CAG	TGG	GTG	252	
	L	T	A	A	H	C	K	K	P	N	L	Q	V	I	78	
	CTG	ACA	GCT	GCC	CAC	TGC	AAA	AAA	CCG	AAT	CTG	CAG	GTG	ATC	294	
	L	G	K	H	N	L	R	Q	T	E	T	F	Q	R	92	
	TTG	GGG	AAA	CAC	AAC	CTA	CGG	CAA	ACA	GAG	ACT	TTC	CAA	AGG	336	
	Q	I	S	V	D	R	T	I	V	H	P	R	Y	N	106	
	CAA	ATC	TCA	GTG	GAC	AGG	ACT	ATT	GTC	CAT	CCC	CGC	TAC	AAC	378	
	P	E	T	H	D	N	D	I	M	M	V	H	L	K	120	
	CCT	GAA	ACC	CAC	GAC	AAT	GAC	ATC	ATG	ATG	GTG	CAT	CTG	AAA	420	
	N	P	V	K	F	S	K	K	I	Q	P	L	P	L	134	
	AAT	CCA	GTC	AAA	TTC	TCT	AAA	AAG	ATC	CAG	CCT	CTG	CCC	TTG	462	
	K	N	D	C	S	E	E	N	P	N	C	Q	I	L	148	
	AAG	AAT	GAC	TGC	TCT	GAG	GAG	AAT	CCC	AAC	TGC	CAG	ATC	CTG	504	
	G	W	G	K	M	E	N	G	D	F	P	D	T	I	162	
	GGC	TGG	GGC	AAG	ATG	GAA	AAT	GGT	GAC	TTC	CCA	GAT	ACC	ATT	546	
	Q	C	A	D	V	H	L	V	P	R	E	Q	C	E	176	
	CAG	TGT	GCT	GAT	GTC	CAT	CTG	GTG	CCC	CGG	GAG	CAG	TGT	GAG	588	
	R	A	Y	P	G	K	I	T	Q	S	M	V	C	A	190	
	CGT	GCC	TAC	CCT	GGC	AAG	ATC	ACC	CAG	AGC	ATG	GTG	TGC	GCA	630	
	G	D	M	K	E	G	N	D	S	C	Q	G	D	S	204	
	GGC	GAC	ATG	AAA	GAA	GGC	AAC	GAT	TCC	TGT	CAG	GGT	GAT	TCT	672	
	G	G	P	L	V	C	G	G	R	L	R	G	L	V	218	
	GGA	GGT	CCC	CTA	GTA	TGT	GGG	GGT	CGC	CTC	CGA	GGG	CTC	GTG	714	

Fig. 1

Fortsetzung von Fig. 1

S	W	G	D	M	P	C	G	S	K	E	K	P	G	232
TCA	TGG	GGT	GAC	ATG	CCC	TGT	GGA	TCA	AAG	GAG	AAG	CCA	GGA	756
V	Y	T	D	V	C	T	H	I	R	W	I	Q	N	246
GTT	TAC	ACC	GAT	GTC	TGC	ACT	CAT	ATC	AGA	TGG	ATC	CAA	AAC	798
I	L	R	N	K	W	L								253
ATC	CTC	AGA	AAC	AAG	TGG	CTG	TGA	-3'						840